



Regeneration of biomimetic tissue architecture by cell sheet engineering

著者	津田 行子
内容記述	Thesis (Ph. D. in Engineering)--University of Tsukuba, (A), no. 4261, 2007.3.23 Includes bibliographical references
発行年	2007
URL	http://hdl.handle.net/2241/90769

氏 名（本籍）	津 田 行 子（福 井 県）		
学 位 の 種 類	博 士（工 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4261 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Regeneration of Biomimetic Tissue Architecture by Cell Sheet Engineering (細胞シート工学による生体模倣組織の再生)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	佐々木 高 義
副 査	筑波大学教授	工学博士	宮 崎 修 一
副 査	東京女子医科大学教授	工学博士	岡 野 光 夫
副 査	筑波大学助教授	博士（工学）	陳 国 平

論 文 の 内 容 の 要 旨

再生医療は、細胞懸濁液を注射やカテーテルにより患部へと移植する細胞懸濁液移植と、培養系で組織様構造を再構築し移植へ供する組織工学に大別される。細胞懸濁液移植の例としては、骨髓移植（造血幹細胞移植）がよく知られており、血液のように組織構造をもたない組織の再生には有効である。しかし、肝硬変や肺線維症など正常組織構造が破壊されている場合、注入した細胞は拡散してしまい、組織に生着できる細胞の割合が低くなる。そのため、ごく限られた面積でしか組織の再生を誘導できないので、十分な組織構造の再生は期待できない。そこで、1980 年代後半に工学的に組織を再構築する「組織工学」という手法がハーバード大学の Vacanti らによって提案された。この手法は組織の形状に合わせて成形した生分解性高分子の多孔質体に細胞を播種し、増殖させた後、生体組織へ移植する方法である。しかし、生体内での高分子の分解・吸収速度と細胞の増殖速度とのバランス制御が困難で、形成される組織の細胞密度が低いこと、高分子の分解物によって引き起こされる周辺組織の炎症反応といった問題がある。

上記のアプローチに対して、東京女子医科大学の岡野らは、器官を構成する組織では複数種の細胞シートが層状をなしていることに着目し、細胞シートを用いて組織を再構築する手法を開発した。細胞シートを得るため、温度変化に応じて親疎水性が変化する高分子（温度応答性高分子）の一種、ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）（PIPAAm）をグラフト化した培養皿を開発した。本培養皿に細胞を播種した後、温度を変化させることによって細胞シートとして剥離、回収することができた。生分解性高分子を使用しないこの新規組織構築法は「細胞シート工学」とよばれ、各器官組織の再生へ向けて系統的な研究が展開されており、角膜上皮、膀胱上皮、歯周組織、皮膚などの比較的薄い組織が構築できることが示されている。

一方で、肺、肝臓、心臓、腎臓などの代謝系組織の再生においては、組織中の細胞に酸素や栄養を供給し、老廃物を除去する上でも、またその生理学的機能を遂行する上でも、毛細血管系の導入、再生が必須である。したがって、1) 単離した細胞の機能維持を可能とする培養系の確立、2) 再生組織内への効果的な毛細血管網の構築、が重要課題として挙げられる。また、近年、マイクロスケールで培養した細胞はより生体内に近い機能をもつことが注目されている。そこで、本論文では、高分子化学、表面修飾、マイクロ加工等の工学的手法を用いて細胞をマイクロパターンニングするための培養表面を創出した。さらに、細胞シートを用いて、

生体組織を模倣した三次元組織の構築を目的とした。

まず、生体組織の構造を模倣したパターン化共培養細胞シートを作製した。二種類の細胞を同一表面上にパターン化共培養し、細胞シートとして回収するために、相転移温度の異なる温度応答性高分子同士をパターン状に固定化した培養表面を設計した。温度応答性高分子 PIPAAm は、疎水性あるいは親水性のモノマーと共重合することで、相転移点が低温側、あるいは高温側へと変化することが知られている。そこで、PIPAAm に疎水性モノマーの *n*-ブチルメタクリレート (BMA) を導入し、PIPAAm ドメインと低温側に転移温度を有する BMA との共グラフトドメイン (直径 1mm) とからなるパターン化温度応答性表面を電子線重合法により作製した。この表面上にラット肝細胞を 27℃ で共グラフトドメインに選択的に接着させた後、ウシ血管内皮細胞 (bEC) を播種し、37℃ で培養した。その結果、bEC は疎水化した PIPAAm ドメインに接着し、2 種類の細胞のパターン化共培養を実現できた。培養温度を 20℃ に下げ両ドメインを親水化すると、共培養細胞層は剥離し、1 枚のシートとして回収できた。また、共培養系において、特に両細胞種の近接部位で肝細胞の機能のひとつであるアルブミン産生能が亢進していた。島状ドメインの直径を 1mm から 0.5mm に変えたところ、両細胞の近接領域がより多い直径 0.5mm パターン化共培養細胞系は直径 1mm の系に比べ、高いアルブミン産生能、尿素合成能を示し、その効果は少なくとも 1 週間以上持続した。共培養により培養皿上で細胞機能を亢進させた共培養細胞組織を剥離、回収する手法はこれまでになく、回収した細胞シートを重層し、より高次な機能をもつ組織を形成する新手法の開発に成功した。

次に、マイクロパターン化細胞シートを用いて、毛細血管網を有する三次元組織の再構築を試みた。ラット由来心筋細胞シートを 3 枚以上重層すると約 80 μ m の厚みとなるが、これ以上厚くすると、組織の内部まで酸素や栄養分が行き届かず、細胞が壊死してしまう。したがって、このような組織を構築するためには、再生組織内への毛細血管系の導入が必須である。ところで、血管内皮細胞を 10-20 μ m の幅でライン状に培養した場合、血管内皮細胞単独、あるいは、別種の細胞と共培養することにより、管腔の構造が形成されることが知られている。そこで、本知見にもとづき直線状のマイクロパターン表面で培養した血管内皮細胞のシートを剥離、回収し、別種の細胞シートと重層することによって、三次元組織中への毛細血管網の構築を目的とした。

フォトリソグラフィ法を用いることによって、シランカップリング剤固定化ガラス基板表面上にレジストパターンを形成した。これに細胞非接着性の親水性ポリマー、ポリアクリルアミド (PAAm) と温度応答性高分子の PIPAAm とを交互にそれぞれ 60 μ m あるいは 20 μ m 幅でグラフト重合し、パターン化温度応答性基板を作製した。本マイクロパターン化表面上で正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (hEC) を培養 (37℃) したところ、hEC は 20 μ m 幅の PIPAAm ドメインのみへ接着した。細胞シート重層化マニピュレーターを用いて、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) シートとパターン化血管内皮細胞を交互に重層することで、パターン化 hEC が、NHDF シートに挟まれた構造をもつ三次元組織を構築することができた。重層化直後では、パターン化 EC は重層化直前と同様、60 μ m 間隔で配列していたが、培養を続けたところ、hEC の一部は網目状の構造を取り、毛細血管様ネットワーク構造を形成した。本手法は、再構成組織中への毛細血管網構築法のひとつとして今後の応用が期待される。

以上に述べたように、本論文では、細胞のマイクロパターンニング法を用いて、二次元および三次元的に生体組織構造を模倣した新規組織構築法を開発した。パターン化培養法を利用して、生体環境に近い構造と機能をもつ三次元組織を構築する方法はこれまでになく、本法は次世代の組織工学の技術基盤として大いに期待できる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、肺、肝臓、心臓などの複雑な構造と機能を有する生体組織の基本構造を工学的なアプローチによって追究し、その三次元構造の構築手法について述べている。このような生体組織の基本構造を構築するためには、複数種の細胞を規則正しく配列させ、一定の空間パターンを形成させる必要がある。また、組織中の細胞に酸素や栄養物質を供給する機能や、老廃物を除去する機能をもつ毛細血管系を導入しなければならない。著者は、生体組織が細胞シートの層状構造からなること、さらに各々の細胞シートでは複数種の細胞が配列してマイクロパターンを形成していることに着眼している。これらの点に基づき、細胞シート工学とマイクロパターンニング法を組み合わせることで、パターン状の細胞シートを形成する手法を確立した。本手法において、応答温度の異なる高分子を利用し、各パターンの細胞接着性が異なるよう工夫した点は高く評価できる。また、マイクロパターン化した血管内皮細胞から管腔構造が形成されることを利用し、本知見を組織中への毛細血管形成に応用した。さらに、各細胞シートを重層することによって三次元構造の構築に成功し、毛細血管のネットワーク化という興味深い現象を見出した。以上のようなアプローチで生体組織の基本構造を構築する手法はこれまでになく、本論文での研究成果は、より高次な機能をもつ組織の形成をめざす次世代の組織工学を切り拓く重要な知見を与えるものとする。

よって、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。